

96ウェルプレートへの継代

ヒト細胞の培養フラスコでは、トリプシン処理やその後のトリプシン阻害処理で細胞を回収します。細胞を遠心分離し、増殖培地で再懸濁させて、数をカウントします。その後適切な細胞数を、滅菌済み96ウェル組織培養プレートのウェルに追加します。細胞の接着と増殖が起こるよう、プレートを37℃、5% CO₂加湿培養器内で1~3日培養します。播種密度は実験要件によって多少異なります。マルチウェルプレートでは10,000細胞/cm²が理想的です。個別の情報については、使用する細胞型に関する『細胞培養手順シート』を参照してください。

 www.lonza.com/research

材料：

1. 60%~90%の細胞密度の正常ヒト細胞を増殖させたT-25フラスコ
2. 96ウェル平底組織培養プレート
3. 5% CO₂/95%空気下、37℃の加湿培養器
4. クリーンベンチまたはその他の滅菌環境
5. マルチチャンネル容量可変ピペット（8または12チャンネル）またはリピーティングピペット
6. マルチチャンネルピペットとセットで使用する滅菌容器

手順

1. 継代培養の準備と継代培養の手順に従います。その後以下の手順2~4に従ってください。
2. 細胞/mlの計算はml単位で行われるため、96ウェルプレートに播種を行う前に、細胞濃度を4倍に増やす必要があります（ウェル毎に250 µlの細胞懸濁液を追加する前に1:4の希釈割合に調整します）。細胞懸濁液を作成する際は細胞濃度を増殖培地で調整します。
3. 希釈細胞懸濁液を滅菌容器に移します。滅菌ピペットチップ用のマルチチャンネル（8または12チャンネル）ピペットを使用し、250 µlの希釈細胞懸濁液をラベルの貼られた96ウェル平底組織培養プレートの各ウェルに追加します。

注記：播種を行っている間は、1回おきに数回ピペットを上下させることによって頻繁に細胞懸濁液を再懸濁させ、各ウェルに同数の細胞を分配するようにします。

4. 37℃/5% CO₂の状態ですら1~3日間プレートにカバーを掛けて培養します（プレート端のウェルから培地が蒸発するため、3日間以上連続の培養は推奨されません）。

注記：96ウェルプレートの培養をバイオアッセイで使用する前に、細胞を顕微鏡下で分裂核の存在を観察し、細胞が活発な増殖を再開したことを確認します。